



## T4 DNA Ligase(Fast)

REF: ABC15223S

## 储运条件

-20°C

## 产品组成

组分	规格
T4 DNA Ligase(Fast) (5 U/μl)	200 μl
10×T4 DNA Ligase Buffer	1 ml
50% PEG	1 ml

注: 1 U=1 Weiss unit

## 产品简介

T4 DNA Ligase(Fast) 由携带 T4 噬菌体 gene 30 的大肠杆菌产生。该酶催化双螺旋 DNA 或 RNA 之间的 5'-磷酸基团和 3'-羟基之间形成磷酸二酯键。该酶在双链 DNA、RNA 或者 DNA/RNA 复合物间可修复单链缺刻，并且可以连接有粘性末端或者平末端的 DNA 片段，但对于单链核酸无活性，主要用于限制性内切酶酶切产物 DNA 片段克隆、基因定点突变与 PCR 产物克隆、线性 DNA 自环化与修复双链 DNA 缺刻。T4 DNA Ligase(Fast) 需要 ATP 作为辅助因子，在室温下完成粘性末端连接反应仅需 10 分钟。

## 酶活单位定义

37°C 条件下，1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [<sup>32</sup>PPi] 转变为活性炭吸附态。1 Weiss unit 等同于约 200 个粘性末端连接反应单位 (CEU)，相当于在 16°C 条件下，30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λ DNA 片段。

## 酶活检测条件

酶活在如下反应混合物中进行测试: 66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 66 μM ATP, 10 mM DTT, 3.3 μM [<sup>32</sup>PPi]。

## 质量控制

## 核酸内切酶残留检测

37°C 条件下，将 200 U 的 T4 DNA Ligase(Fast) 与 1 μg 的 pUC19 DNA 中温育 4 h，未检测出由共价闭合环状 DNA 转变为带有缺刻的 DNA。

## 核酸外切酶残留检测

将酶液与双链 DNA 底物在 37°C 温育 16 h，通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

## 蓝白斑测试

室温条件下，使用 30 U T4 DNA Ligase(Fast) 连接 pUC57 DNA/HindIII, pUC57 DNA/PstI 或 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1 h，然后用 E. coli XL1-Blue 感受态细胞转化连接产物，检测到少于 1% 的白斑。

## 使用方法

## 1. DNA 插入片段连接至载体 DNA (粘性末端连接)

① 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1 (片段: 载体摩尔比)
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	1 U (0.2 μl)
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并孵育，22°C 温育 10 min;

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电感受态细胞的转化。

注: 如果连接反应产物用于电转化，应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

## 2. DNA 插入片段连接至载体 DNA (平末端连接)

① 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1 (片段: 载体摩尔比)
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	5 U (1 μl)
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并孵育，22°C 温育 1 h;

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电感受态细胞的转化。

注: 如果连接反应产物用于电转化，应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

### 3. 线性 DNA 自环化

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化 DNA	10~50 ng
10×T4 DNA Ligase Buffer	5 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	5 U (1 μl)
Nuclease-Free Water	To 50 μl

② 彻底混匀并瞬离，22℃温育 10 min；

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电转感受态细胞的转化。

注：如果连接反应产物用于电转化，应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

### 4. 接头连接

双链寡核苷酸接头经常被用于在插入片段上产生粘性末端。接头通常包含限制酶识别位点，在连接后经酶切处理产生和克隆载体匹配的粘端。有时候接头已包含与克隆载体匹配的粘端，此时无需在接头连接完成后进行插入片段的进一步处理。

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化 DNA	100~500 ng
磷酸化接头	1~2 μg
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	2 U (0.4 μl)
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 彻底混匀并瞬离，22℃温育 10 min；

③ 在 65℃作用 10 min 或者 70℃作用 5 min，进行热失活。

注 1：添加 1 mM ATP 的条件下，T4 DNA Ligase(Fast) 在 CutOne™酶切缓冲液中具有 100% 的活力。因此，接头连接反应时可以在 CutOne™酶切缓冲液中进行，以简化“接头连接-酶切”实验流程。具体方法为：向接头连接体系中添加 ATP 至终浓度 1 mM，接头连接反应完成后，先失活 T4 DNA Ligase(Fast)。然后，再在体系中加入适量的 LightNing™快速内切酶，最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。注 2：CutOne™酶切缓冲液中不含 ATP 组分，爱必胜为您提供独立包装的 100mM ATP 母液（货号 ABC21934），敬请选购！

### 注意事项

1. T4 DNA Ligase(Fast) 在浓度高于 200 mM 的 NaCl 或 KCl 中会被强烈抑制；
2. 连接反应液添加量不应该超过感受态细胞体积的 10%，不推荐体系中加入过量的 T4 DNA Ligase(Fast)；
3. 与 T4 DNA Ligase(Fast) 结合的 DNA 可能会在琼脂糖凝胶中出现带移或弥散，为了避免此现象，可以在上样前对酶进行热失活，必要时加入适量的 SDS；
4. 聚乙二醇 (PEG) 能极大地提高平末端连接的连接效率，PEG 8000 的推荐添加量是连接体系的 5% (w/v)；
5. 电转化效率可能通过对 T4 DNA Ligase(Fast) 热失活或者使用离心柱或者氯仿抽提纯化 DNA 方式来提高；
6. 转化子数目可通过延长反应时间至 1 h 而增加。